

les virus planctoniques : un compartiment biologique clé des milieux aquatiques

Sébastien Personnic¹, Solange Duhamel^{1,2}, Yvan Bettarel³,
Télesphore Sime-Ngando⁴, Stéphan Jacquet¹

¹ INRA UMR 42, Centre alpin de recherche sur les réseaux trophiques des écosystèmes limniques, station INRA d'hydrobiologie lacustre, équipe d'écologie microbienne aquatique, 75 avenue de Corzent, 74203 Thonon-les-Bains
² Centre d'océanologie de Marseille, CNRS, UMR 6117, laboratoire de Microbiologie/géochimie/écologie marine (LMGEM), parc scientifique et technologique de Luminy, 13288 Marseille
³ Centre IRD de Bel Air, BP 1386, Dakar, Sénégal
⁴ CNRS, UMR 6023, laboratoire de Biologie des protistes, université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand 2), 63177 Aubière
jacquet@thonon.inra.fr ; tel : 04 50 26 78 12 ; fax : 04 50 26 07 60

Les virus constituent l'entité biologique la plus abondante dans les écosystèmes aquatiques. Ce sont, on le sait, des parasites obligatoires capables d'infecter potentiellement toutes les cellules vivantes (de la cellule humaine à la bactérie) et l'on reconnaît aujourd'hui que les conséquences de leurs activités sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques sont considérables. Les virus interviennent dans de nombreux processus écologiques et biogéochimiques, tels que le recyclage des nutriments, la mortalité bactérienne et algale, et affectent également la diversité de l'ensemble du compartiment microbien de manière directe ou indirecte. Cet article a pour but de dresser l'état des connaissances de l'écologie des virus planctoniques, acquises au cours des 15 dernières années avec le développement d'outils méthodologiques toujours plus performants.



Introduction

Les microorganismes jouent un rôle prépondérant dans les flux de matière et d'énergie au sein des écosystèmes aquatiques. L'écologie microbienne aquatique s'intéresse aux microorganismes qui peuplent les milieux aquatiques aussi bien dulçaquicoles que marins. Au sein des microorganismes, nous distinguons les bactéries auto- et hétérotrophes, les protistes auto- et hétérotrophes, ainsi que les champignons dont nous ne ferons pas état dans cet article. À ces compartiments aquatiques microscopiques, nous ajoutons les virus, qui ne constituent pas des microorganismes *sensu stricto* puisqu'ils sont dépourvus de métabolisme autonome (encadré 1). L'écologie virale étudie les interactions entre les virus et leur environnement physique, chimique et biologique. La microscopie électronique à transmission a permis de démontrer l'importance quantitative des virus aquatiques libres, notamment dans les écosystèmes marins où l'on a compté plus de 10 000 particules virales par millilitre (Torella et Morita, 1979). Et ce n'était qu'un début !

Aujourd'hui, avec le développement de méthodes de plus en plus performantes pour estimer les abondances et la diversité des virus, on sait que ces particules sont présentes dans tous les écosystèmes aquatiques (océans, mers, estuaires, golfes, lacs, rivières, lagunes, sources hydrothermales, sédiments, glace, etc.), à toutes les latitudes (polaires, tempérées, tropicales) et à tous les niveaux trophiques, des plus pauvres aux plus riches en termes de nutriments par exemple (Fuhrman et Suttle, 1993 ; Wommack et Colwell 2000 ; Sime- Ngando *et al.*, 2003 ; Weinbauer, 2004). Quelle que soit la méthodologie employée, leurs concentrations naturelles dépassent généralement 1 à 10 millions de particules par millilitre d'eau, et toujours, sauf rares exceptions, celles des bactéries. C'est typiquement le cas de tous les écosystèmes lacustres que nous étudions à Thonon-les-Bains (lacs Léman, du Bourget et d'Annecy) mais il est vrai que ces valeurs sont « écosystème-dépendantes ». Néanmoins, on reconnaît aujourd'hui que les virus constituent l'entité biologique la plus abondante dans les écosystèmes aquatiques. Cette importance quantitative du viroplankton a naturellement amené les chercheurs à étudier le rôle de ces particules dans la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques.

Encadré 1 : Micro-organismes et virus

Virus : particule microscopique constituée simplement d'un génome (ADN ou ARN) enveloppé par une coque ou membrane protéique (capside). Parasites obligatoires, les virus ont besoin d'un hôte spécifique pour se multiplier. Des maladies, comme la grippe, la varicelle mais aussi le SIDA, sont provoquées par des virus. Outre l'homme, les animaux et les plantes, les microorganismes de l'environnement sont sensibles aux infections virales.

Bactérie : être vivant unicellulaire dépourvu de noyau (e.g. procaryote).

Phage : syn. virus de bactérie, terme utilisé pour caractériser les virus de bactéries hétérotrophes (bactériophages) et autotrophes (cyanophages).

Autotrophe : désigne un organisme capable de se multiplier en utilisant des éléments minéraux simples comme unique source de carbone, d'azote ou de phosphore.

Hétérotrophe : désigne un organisme incapable d'utiliser directement les éléments minéraux simples (en théorie), ayant recours à la consommation de la matière organique pour ses besoins énergétiques.

Protiste : être vivant unicellulaire pourvu d'un noyau (e.g. eucaryote). Les algues microscopiques aquatiques qui forment l'essentiel du phytoplancton appartiennent au règne des protistes autotrophes. Les protistes hétérotrophes sont les protozoaires.

Champignon : être vivant hétérotrophe pluricellulaire dont les cellules sont pourvues d'un noyau différencié et d'une paroi. Organismes classés dans un règne à part, celui des Fungi.

La microscopie électronique à transmission a permis d'identifier des particules virales à l'intérieur de microorganismes aussi diversifiés que les bactéries, les cyanobactéries ou encore les micro-algues. On sait maintenant que les microorganismes représentent les principales cibles pour l'infection virale en raison de leur forte abondance naturelle et donc de la probabilité élevée de rencontre avec un virus.

Les virus représentent une cause importante de la mortalité des microorganismes en milieu aquatique.

D'autre part, en tant que réservoirs extracellulaires du patrimoine génétique de leurs cellules hôtes, ils représentent de véritables vecteurs de transfert horizontaux de gènes entre différentes populations ou souches de microorganismes présents dans les écosystèmes aquatiques.

Nous sommes donc, sans aucun doute, en présence d'agents dont l'impact sur la composition, la diversité, la structure et le fonctionnement des réseaux trophiques microbiens aquatiques est considérable. Et encore largement insoupçonné ! Voir les revues complètes de : Fuhrman, 1999 ; Wommack et Colwell, 2000 ; Weinbauer, 2004 ; Weinbauer et Rassoulzadegan, 2004 ; Suttle, 2005.

Qu'est-ce qu'un virus ?

Les virus représentent les plus petites entités biologiques connues à ce jour, avec une taille variant généralement entre 20 et 200 nanomètres (majorité <60 nm). Cette limite des 200 nm est aujourd'hui remise en question avec la découverte de virus dont la taille peut atteindre 400 nm, comme les Mimivirus (Raoult *et al.*, 2004)¹. Les virus sont des agents infectieux dont l'organisation structurale est simple et acellulaire. Un virus est constitué d'au moins un acide nucléique (ADN ou ARN simple ou double brin) entouré par une coque protéique ou capside. La capside est une structure moléculaire faite de nombreuses copies d'une ou de quelques sous-unités protéiques ou protomères. Elle protège le matériel génétique et favorise son transfert d'une cellule hôte à une autre. On distingue trois grands types morphologiques de virions (particules virales) : virus à capside icosaédrique, hélicoïdale, virus à enveloppe.

On estime qu'en moyenne les virus sont composés pour moitié par l'acide nucléique et pour moitié par des protéines. Un virus bactériophage contiendrait environ 0,08 fentogrammes d'ADN (contre 2,6 pour les bactéries). Cela nous laisse néanmoins entrevoir l'importance des éléments azotés et phosphorés pour ces particules. Les virus ne présentent aucune forme de métabolisme autonome. Pour tout processus requérant de l'énergie, y compris la réplication, ils doivent avoir recours à une cellule hôte sensible et permmissible.

Le cycle de réplication chez les virus comprend 4 étapes fondamentales :

- la fixation (adsorption), la pénétration (*via* un récepteur membranaire généralement impliqué dans la prise de nutriments) et la décapsidation ;
- la réplication (duplication du génome, transcription, traduction) ;
- l'assemblage des constituants viraux ;
- la libération des virus nouvellement formés.

Ce cycle en quatre étapes est dit de type lytique quand la libération des virus se fait par lyse (éclatement) de la cellule hôte et de type chronique quand elle se fait par bourgeonnement ou par extrusion de filaments de la membrane de la cellule hôte. L'infection chronique comme le vrai parasitisme affecte aussi le métabolisme cellulaire mais contrairement au cycle lytique, les cellules ne sont pas lysées.

Les étapes de réplication, assemblage et libération de néovirus ne sont pas forcément immédiates après l'introduction du virus dans la cellule hôte. En effet, l'ADN du virus peut s'intégrer dans le génome (ADN) de la cellule hôte, formant un « provirus ». Ce dernier va se reproduire lors du cycle de réplication de l'ADN de la cellule « infectée » et être transmis à de multiples générations. Ce cycle viral caractérisé par la formation d'un « provirus » est appelé cycle lysogénique. Le provirus peut être activé par la modification de facteurs environnementaux et reprendre un cycle lytique, avec réplication du génome viral, assemblages et lyse de la cellule hôte. Notons enfin le décalage entre les virus et les autres organismes en termes de nombre de gènes présents. En moyenne, on dénombre 165 gènes (par exemple pour le virus ADN T4) alors qu'une bactérie en contient près de 4 000, une cellule humaine environ 20 000. Mais on découvre aujourd'hui de nouveaux virus, notamment dans le milieu aquatique, dont le nombre de gènes est bien plus important et dont les fonctions rappellent celles des cellules eucaryotes.

¹ Ce virus, avec une taille de génome de 1,2 mégabase, pourrait être à l'origine d'une modification de notre conception de l'arbre phylogénétique eucaryotes-eubactéries-archaeobactéries.

Quels hôtes pour les virus aquatiques ?

Un virus est généralement spécifique d'une cellule hôte donnée. Il est donc caractéristique d'une espèce, voire d'une variété ou souche de cette espèce. Ainsi, certains virus s'attaquent spécifiquement aux procaryotes (bactériophages, encadré 2), les cyanobactéries y compris (cyanophages), aux plantes, aux animaux ou aux hommes. On sait aujourd'hui que les Bactéries (*Bacteria*) et les Archébactéries (*Archaea*) sont les cellules les plus abondantes dans les écosystèmes aquatiques ; il est donc naturellement admis que la majeure partie de la communauté virale est composée de bactériophages (Fuhrman, 1999 ; Wommack et Colwell, 2000 ; Weinbauer, 2004). Sachant que les milieux aquatiques constituent la plus grande partie de la « biosphère » de notre planète, il est alors logique de penser que les phages marins et d'eaux douces sont probablement les entités biologiques les plus abondantes sur terre (Paul *et al.*, 2002 ; Sime-Ngando *et al.*, 2003). Les bactériophages sont le groupe de virus le plus important par le nombre de descriptions (Ackermann, 2003). Ils sont représentés chez les Archées et les Bactéries et ils ont colonisé tous les habitats connus (Ackermann et Dubow, 1987 ; Wommack et Colwell, 2000). Dans les systèmes aquatiques, l'abondance et la dynamique virales commencent à être assez bien documentées, surtout dans la zone pélagique. Les virus du sédiment (zone benthique) sont beaucoup plus difficiles à étudier que ceux de la colonne d'eau. En effet, dans le sédiment, les particules virales sont généralement adsorbées sur les particules organiques et minérales. Or les sédiments aquatiques accueillent une grande partie de la biomasse et de la biodiversité bactériennes et jouent un rôle principal dans les cycles biogéochimiques. La découverte de l'abondance du viriobenthos, jusqu'à 1 000 fois plus élevée que l'abondance du virioplancton, a accru l'intérêt de la communauté scientifique pour l'étude de ce compartiment (Paul *et al.*, 1993 ; Maranger et Bird, 1996 ; Danovaro *et al.*, 1999). Pour Mei et Danovaro (2004) les taux élevés de production de virus benthiques peuvent avoir un effet significatif sur la dynamique bactérienne benthique et la production de virus devrait être incluse dans les modèles biogéochimiques des sédiments aquatiques. Middleboe et ses co-auteurs ont enregistré une forte activité virale dans les sédiments, ce qui présente des implications importantes pour le recyclage du carbone dans les écosystèmes aquatiques (Glud et Middelboe, 2004 ; Middelboe *et al.*, 2003). Dans les lacs, ce n'est pas forcément vrai néanmoins (Duhamel et Jacquet, 2006 ; Bettarel *et al.*, 2006 ; Filippini *et al.*, 2006). De très faibles taux d'infection semblent plutôt être la règle.

Encadré 2 : Un peu d'histoire des bactériophages

Pendant la Première Guerre mondiale, le microbiologiste Félix d'Hérelle examine des soldats atteints de dysenterie. Certains malades arrivent à vaincre cette maladie, alors que d'autres n'y arrivent pas. D'Hérelle en trouve la raison : les bactéries sont attaquées et détruites par un ennemi naturel, qu'il nomme « bactériophage » (littéralement mangeur de bactéries). Il s'agit d'un virus ! En « s'agrippant » à la bactérie, les bactériophages lui injectent leur matériel génétique, provoquant la synthèse de nouveaux virus intracellulaires jusqu'à l'éclatement de la cellule, devenue trop petite pour abriter une telle densité de phages. L'invasion se poursuit tant qu'il reste des bactéries. Les observations de Félix d'Hérelle sont présentées devant les membres de l'Institut Pasteur en 1917, deux ans après que le bactériologiste anglais, William Twort, ait lui-même noté l'action de cet agent jusque-là inconnu. La découverte de Félix d'Hérelle suscita bien des espoirs sur le plan thérapeutique (voir plus loin : la thérapie phagique). L'étude des bactériophages contribua à la naissance de la biologie moléculaire. Aujourd'hui, les Rétrovirus, les Adénovirus et les Herpèsvirus sont principalement utilisés comme vecteurs viraux défectifs dans les transferts de gènes thérapeutiques (thérapie génique) alors que les Bactériophages sont principalement utilisés dans le transfert, l'expression et la réplication d'ADN étranger dans une cellule hôte en vue d'un clonage moléculaire.

Les grands groupes de virus et la diversité virale

Le comité international sur la taxonomie des virus (ICTV) a établi depuis 1966 un système universel de classification des virus. Le système utilise les taxa connus. Les virus ne forment pas un règne comme tel et, pour la plupart des scientifiques, ne sont même pas considérés comme des organismes vivants, mais la découverte des Mimivirus et d'autres virus géants, dont les gènes préfigurent ou

ressemblent à ceux des cellules eucaryotes, pourrait modifier cela ! Face à cette complexité taxonomique, on utilise de préférence le terme de particules virales. Le concept « d'espèce » leur est néanmoins appliqué. Une espèce virale est définie comme « ... une classe polyphylétique (classe fondée sur des convergences au sein de laquelle il manque l'ancêtre commun à tous ses membres) de virus qui constitue une lignée qui se reproduit et occupe une niche écologique particulière » (Regenmortel, 1992).

Actuellement les « espèces » virales sont classées selon 5 principaux critères : la nature de l'acide nucléique (ADN ou ARN) ; le nombre de brins dont il est constitué ; la présence ou non d'une enveloppe autour de la capsid ; la symétrie de la capsid (hélicoïdale ou icosaédrique) ; la taille du virus. La microscopie électronique à transmission est couramment utilisée pour apprécier cette diversité morphologique. En milieu aquatique, le diamètre de la capsid des virus est généralement inférieur à 100 nm (sauf pour les virus de microalgues) et possède une queue de longueur variable. Plus de 5 100 bactériophages ont été examinés en microscopie électronique depuis 1959, révélant qu'environ 96 % des phages présentent une queue (contractile ou non) et que seulement 3,6 % sont cubiques, filamenteux ou pléomorphes (Ackermann, 2001). Cette connaissance limitée de la diversité du monde viral est clairement liée aux difficultés méthodologiques.

Depuis l'avènement des outils de la biologie moléculaire, de nombreuses études ont révélé l'incroyable diversité virale de cyanobactéries et/ou de microalgues par exemple (Suttle, 2000 ; Breitbart *et al.*, 2002 ; Venter *et al.*, 2004). Comme il n'y a pas de gène universel commun à l'ensemble des virus, il n'est pas possible d'accéder à la diversité virale non cultivable en utilisant des approches analogues au profilage de l'ADN ribosomal, comme cela est classiquement établi pour les bactéries. Aujourd'hui, les analyses de type métagénomique des communautés virales permettent de contourner ce problème et peuvent fournir de nombreux détails sur la structure et la composition des communautés naturelles (Edwards et Rohwer, 2005). Breitbart *et al.* (2002) ont évalué le nombre de génotypes viraux à plus de 7 000 dans un échantillon d'eau de mer côtière de seulement 200 litres. Cette estimation surpasse celles données pour la diversité bactérienne et vient conforter l'idée que la diversité virale est probablement énorme et très largement insoupçonnée. De plus, cette valeur est en accord avec le rapport d'abondance de 10 virus pour 1 bactérie généralement enregistré dans les eaux côtières de surface (Wommack et Colwell, 2000). Il y aurait en moyenne environ 10 virus spécifiques pour une espèce bactérienne donnée.

Comment compter les virus aquatiques ?

Suivant le degré trophique des écosystèmes aquatiques, la saison et encore la profondeur des prélèvements, les concentrations en virus libres évoluent généralement et en moyenne entre 10⁵ et 10⁸ particules par millilitre. Aujourd'hui, le dénombrement des virus planctoniques s'effectue essentiellement à l'aide de trois approches méthodologiques réalisées au moyen de trois techniques différentes.

La microscopie électronique à transmission permet de dénombrer les virus, de caractériser leur morphologie et d'estimer l'importance relative des cellules bactériennes infectées. Cette technique, à la fois globale et invasive, permet d'accéder à des paramètres clefs qu'aucune des deux autres techniques ne peut renseigner (charge cellulaire en virus, pourcentage de mortalité induite par action virale).

La microscopie à épifluorescence, après coloration des acides nucléiques par des marqueurs fluorescents extrêmement sensibles, permet d'effectuer le dénombrement des virus libres (Fuhrman et Noble, 1995 ; Bettarel *et al.*, 2000).

Plus récemment, des protocoles de dénombrement des virus libres en cytométrie en flux ont été développés dans certains laboratoires dont le nôtre.

L'utilisation des sondes fluorescentes, marquant les acides nucléiques, permet une différenciation fiable des populations virales et bactériennes avec les débris et autres particules en suspension, donc de détecter de nombreuses populations ou groupes de virus. Nous cherchons actuellement à identifier quelle signature relève des bactériophages, des cyanophages, des virus de microalgues. Dans quelles proportions ? Peut-on établir une règle générale ? Nous avons comparé l'efficacité de comptage des virus bactériophages libres d'échantillons naturels aquatiques, à partir de ces trois techniques, sur des échantillons du lac du Bourget, prélevés et conditionnés de la même manière entre trois laboratoires indépendants. Des comptages ont été faits en double aveugle par différents scientifiques. Et qu'avons-nous trouvé ? Des différences significatives entre les différentes méthodes de comptage, qui révèlent combien les comparaisons entre écosystèmes sont difficiles, ce que pourtant la littérature scientifique propose sans se poser trop de questions ! Il n'y a malheureusement pas de solution réelle à ce problème. Et l'avoir en tête n'est déjà pas si mal.

Le dénombrement des virus du sédiment implique une extraction délicate pour les séparer de la matière sédimentaire. Après Drake *et al.* (1998), Danovaro *et al.* (2001) ont mené l'un des premiers travaux sur le sujet en milieu marin. En nous basant sur leur protocole pour la détermination des abondances virales, nous avons pu optimiser la technique de comptage et trouvé des concentrations très élevées de bactéries et de virus dans les premiers centimètres des sédiments des lacs Léman et du Bourget (Duhamel et Jacquet, 2006).

Nous ne développons pas ici d'autres méthodes de quantification virale spécifiques d'un virus ou d'une famille de virus en particulier. Les techniques de comptage avec leurs avantages et leurs désavantages sont consultables sur Internet : <http://jacquet.stephan.free.fr/diaporamas.htm>

Rôles fonctionnels des virus

Rôle fonctionnel dans les cycles biogéochimiques (boucle microbienne, flux de carbone)

La communauté microbienne n'a été prise en compte dans l'étude des grands cycles biogéochimiques que tardivement. Il faut attendre Azam *et al.* (1983) pour qu'apparaisse le concept de boucle microbienne (figure 1) et que le compartiment microbien soit reconnu comme clé dans le fonctionnement et la compréhension des processus biogéochimiques en milieu aquatique. La boucle microbienne est une voie de transfert du carbone dans les écosystèmes aquatiques, basée sur l'utilisation par les bactéries de la matière organique dissoute, issue notamment de l'excrétion phytoplanctonique (on parle d'exsudats). Le carbone bactérien entre alors dans la chaîne trophique *via* le broutage des bactéries par le protozooplancton et, éventuellement, par certains composants du métazooplancton. Quels rôles jouent les virus dans ces cycles et dans la boucle microbienne ? En lysant les microbes autotrophes et hétérotrophes, les phages modulent les flux de carbone au travers de la chaîne alimentaire (Fuhrman, 1999). Lorsqu'une cellule hôte est lysée, les virus libérés ainsi que les débris cellulaires constituent des produits (protéines, acides nucléiques et autres composants cellulaires) riches en éléments azotés, phosphorés ou carbonés, potentiellement utilisables par les bactéries et le phytoplancton comme éléments nutritifs (Gobler *et al.*, 1997 ; Noble *et al.*, 1999). L'activité virale transforme donc le carbone particulaire en carbone dissous, court-circuitant ainsi le flux de carbone et de nutriments vers les consommateurs supérieurs de la chaîne alimentaire aquatique.

Pour illustrer ce concept, Wilhelm et Suttle (1999) ont démontré, en utilisant un modèle très simple, que 6 à 26 % du carbone organique fixé par photosynthèse est recyclé en matière organique dissoute par la lyse virale.

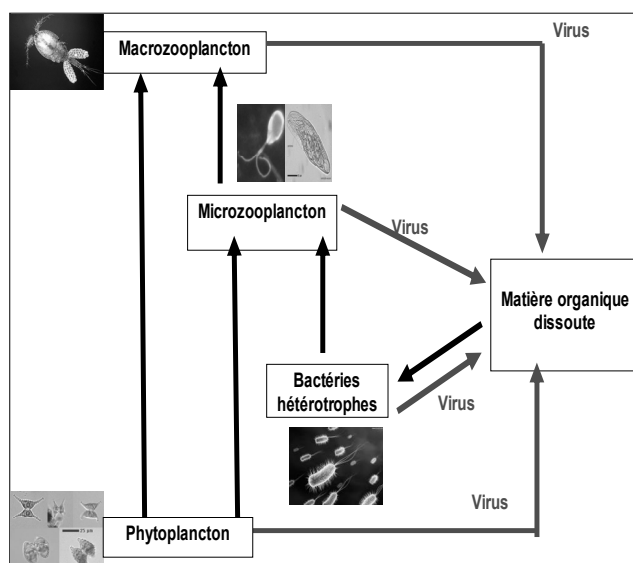


Figure 1. Le « court-circuit » viral dans la chaîne trophique microbienne aquatique. En milieu marin, le pourcentage de production de carbone issu de la lyse virale sur les bactéries hétérotrophes varie entre 8 % et 42 % du total au large et entre 6,8 % et 25 % dans les eaux côtières (d'après Wilhelm et Suttle, 1999).

Par ailleurs, les acides nucléiques sont des produits de la lyse virale riches en phosphore. Paul *et al.* (1991) suggèrent qu'entre 1 et 12 % de l'ADN total « dissous » dans l'eau de mer se trouve dans les virus. Aussi, sachant que les acides nucléiques sont des composés phosphorés et que le temps de renouvellement de l'ADN dans l'eau de mer est rapide, l'ADN viral encapsidé pourrait représenter un réservoir important de phosphore organique (Bratbak *et al.*, 1994).

Enfin, pour finir avec l'importance relative des virus dans les cycles biogéochimiques, nous pouvons citer Curtis Suttle, qui estime que dans les océans, les virus sont responsables de 20 % de la biomasse² produite chaque jour, ce qui est considérable ! Cette incidence sur la (re)distribution des nutriments dans les écosystèmes aquatiques constitue un pan clé de la recherche pour mieux comprendre la dynamique des populations planctoniques à la base des chaînes trophiques pélagiques. L'équipe INRA de Thonon-les-Bains commence à s'y intéresser au travers de la thèse de Lydia Berdjeb.

Effets sur les blooms phytoplanctoniques : vers un contrôle biologique ?

Plusieurs équipes de recherche se sont intéressées aux virus en tant qu'agents de contrôle des efflorescences algales (ou « blooms »). L'équipe de Keizo Nagasaki au Japon s'est ainsi penchée sur le contrôle des proliférations de l'algue phytoplanctonique toxique *Heterosigma akashiwo* dans la baie d'Hiroshima au Japon qui conduisent, chaque année à la mort de milliers de tonnes de poissons. Ils ont découvert que le principal facteur de contrôle de cette efflorescence était un virus. En 1999, ces auteurs envisageaient même d'utiliser industriellement le virus isolé de cette algue pour en contrôler les efflorescences (Nagasaki *et al.*, 1999). Toutefois, leurs travaux ont aussi révélé que l'intra-spécificité de son mode d'action semble être l'obstacle le plus sérieux à son utilisation comme agent de contrôle de la prolifération d'*H. akashiwo*. En 2000, les résultats de Tarutani *et al.* ont suggéré que

² Ici le terme de biomasse désigne l'énergie provenant de la dégradation des matières organiques.

les virus peuvent jouer un rôle important dans la détermination de la composition clonale et le maintien de la diversité clonale des populations d'*H. akashiwo*. L'intérêt pour ce type d'application (contrôle biologique) n'est plus si fort aujourd'hui, les chercheurs étant confrontés à un problème bien plus complexe que celui attendu : les espèces phytoplanctoniques naturelles capables de proliférer sont composées de cellules plus ou moins résistantes ou sensibles à l'infection virale. D'après Nagasaki *et al.*, il faudrait s'intéresser aux effets d'un «cocktail» de clones à *H. akashiwo* avec différents degrés de spécificité d'infection. À cela s'ajoute la difficulté de rendre un tel contrôle biologique efficace dans des écosystèmes lacustres de grande taille. Il faudrait déverser des quantités surréalistes de particules infectieuses de manière homogène pour espérer un résultat probant. Avec des hélicoptères ? Quand ? Comment ? Avec quelles conséquences sur la structure et le fonctionnement de l'écosystème ? Bien des questions et pas forcément de réponses évidentes ou sensées !

Très récemment, Brussaard *et al.* ont montré, grâce notamment à la modélisation mathématique, que c'est l'action conjointe des virus et d'autres paramètres clefs (les nutriments, la lumière et les prédateurs) qui est responsable du contrôle et/ou du déclin d'une espèce phytoplanctonique envahissante de nombreuses eaux côtières, comme *Phaeocystis pouchetti* (Ruardij *et al.*, 2005).

Un autre exemple de l'importance écologique de virus de microalgues est celui d'*Emiliana huxleyi*, une algue microscopique unicellulaire eucaryote calcifiée. Cette algue abondante dans l'Atlantique nord peut former des efflorescences si grandes qu'elles peuvent être vues de l'espace. Cet organisme, comme d'autres algues, peut produire une substance appelée le diméthyl sulfure (DMS) lors de sa dégradation dans l'eau de mer, très largement causée par la lyse virale. Le DMS ainsi produit peut se répandre dans l'atmosphère et, après oxydation, être responsable d'une part non négligeable de l'effet de serre.

Une autre découverte considérable concernant les virus d'*Emiliana huxleyi* a été faite par des équipes britanniques (Wilson *et al.*) Ils ont découvert un virus constitué de 472 gènes, ce qui pour le moment constitue l'un des records (à titre de comparaison, le VIH ne possède que neuf gènes). Parmi ces gènes, ils ont découvert un ensemble de gènes responsables de la production de céramide ! Ce composant est un anti-ride et un anti-vieillessement utilisé dans les cosmétiques. Plus couramment rencontrée dans certaines cellules animales et végétales, la céramide peut contrôler le mécanisme de mort cellulaire programmée (appelé apoptose). Les virus auraient donc la faculté de contrôler le moment où leur hôte doit mourir, ou sa survie, ce qui est tout à fait incroyable.

Ainsi, ils se servent des cellules comme d'une usine pour se répliquer, ils en prennent le contrôle total et final avant de s'en débarrasser. Ce mécanisme permet d'entrevoir de nombreux développements pour maîtriser des maladies menaçant la survie de l'individu ou même le vieillissement.

Un autre exemple spectaculaire de détournement de la machinerie cellulaire de l'hôte concerne les cyanobactéries et leurs virus. Nous savons que les océans sont responsables de la moitié de la photosynthèse de notre planète et, dans les régions pauvres en nutriments, deux genres de cyanobactéries particulièrement, *Synechococcus* (Waterbury *et al.*, 1979) et *Prochlorococcus* (Chisohlm *et al.*, 1988), contribuent à ce processus pour 32 à 89 %. En 2003, Mann *et al.* ont découvert que les cyanophages infectant *Synechococcus* possèdent des gènes codants pour des composants clés de l'appareil photosynthétique ! Cette découverte a permis depuis de montrer que l'expression de ces protéines photosynthétiques codées par les gènes viraux permettrait aux cellules infectées de ne pas cesser leur activité de photosynthèse. Elles travaillent jusqu'au dernier moment. Ainsi peut-on dire qu'une proportion de l'oxygène que nous respirons est en réalité un sous-produit de l'infection virale ! En 2005, les génomes complets de plusieurs phages infectant des cyanobactéries marines ont été publiés, révélant différentes façons de « manipuler » la physiologie des cellules infectées. La machinerie virale est tout simplement stupéfiante.

Contrôle de la mortalité bactérienne

Aujourd'hui les laboratoires de microbiologie aquatique cherchent à comparer les pertes bactériennes liées à l'activité bactériovore des protistes phagotrophes avec celles liées à l'infection virale. Différentes études sur ce sujet – en milieu marin – ont fourni des résultats contrastés, en montrant que la lyse virale est capable de contrôler la production bactérienne à hauteur de 20, 50, voire 90 à 100 %. Toutes s'accordent pourtant pour affirmer que la lyse virale peut occasionnellement prévaloir sur la prédation des protistes dans la mortalité bactérienne.

Pour la compréhension de la dynamique virale et du rôle des phages dans les systèmes d'eaux douces, nos premiers résultats permettent de constater que les virus pouvaient être responsables jusqu'à 50 % de la mortalité bactérienne journalière en l'absence d'autres prédateurs (Lac du Bourget, mai 2003, par exemple). La part attribuable aux prédateurs « classiques » l'emportait généralement sur la lyse virale (10 % pour les virus contre 30 % pour les flagellés au mois de mai 2004 dans le lac Léman, par exemple). Dans l'avenir, nous approfondirons cette question du contrôle viral des communautés bactériennes et phytoplanctoniques – la base de la pyramide alimentaire lacustre – en comparant des écosystèmes caractérisés par des situations trophiques contrastées, comme le lac d'Annecy, de statut oligotrophe (pauvre en nutriments), et les lacs Léman et du Bourget dits mésotrophes (moyennement riches).

Contrôle direct de la diversité bactérienne : « *killing the winner* »

La diversité phénotypique et génotypique des populations de phages est directement liée à l'interaction entre les phages et leurs hôtes (Weinbauer, 2004). Sans hôte, pas de parasite. Sans hôte avec ses particularités biochimiques, pas de virus spécifiques. Les scientifiques se servent de cette propriété d'interaction pour étudier l'influence des bactériophages sur la diversité du bactérioplancton. D'après le concept formulé par Thingstad et Lignell, « *killing the winner* » (1997), les virus ordinairement tuent les microorganismes les plus compétitifs et peuvent donc garder le contrôle sur ces populations ou espèces dominantes. En effet, lorsqu'un groupe bactérien devient important numériquement, la probabilité de rencontrer son pathogène augmente, et par conséquent la lyse virale s'exerce à une intensité plus forte sur cette population. Ceci permet la co-existence de populations moins compétitives et minoritaires, tout en assurant le maintien de la diversité bactérienne.

Il a été montré que les phages se propagent en fonction de la densité en hôtes et peuvent alors changer la composition clonale de l'hôte, par le biais notamment de mécanismes liés à la résistance. (Middelboe *et al.*, 2001 ; Tarutani *et al.*, 2000 ; Jacquet *et al.*, 2002 ; Tomaru *et al.*, 2004). Dans les eaux douces, l'incubation d'un échantillon rempli de bactéries avec ou sans les virus du même milieu se traduit par des changements dans les abondances, les taux de croissance et la diversité bactérienne (Weinbauer et Hofle, 1998 ; Suttle, 1992 ; Peduzzi et Weinbauer, 1993).

Ce concept est donc largement accepté mais un effet indirect est également possible : un événement massif de lyse d'une communauté phytoplanctonique ou bactérienne se traduirait par une libération de matière organique dont la biodisponibilité profiterait à la communauté bactérienne ; sa structure pourrait alors être modifiée de manière notable (Van Hannen *et al.* 1999). Les changements de la composition de la matière organique dissoute sont connus pour induire des changements de la communauté bactérienne (Lebaron *et al.*, 1999 ; Riemann *et al.*, 2000 ; Arrieta et Herndl, 2002).

Contrôle indirect de la diversité bactérienne par le transfert horizontal³ de gènes

Les virus peuvent jouer un rôle central dans le transfert de gènes entre microorganismes, à travers deux processus : la transformation et la transduction.

Dans la transformation, le virus induit le transfert génétique de façon indirecte en provoquant la libération de l'ADN de la cellule hôte lysée, qui peut être récupéré et utilisé par un autre microorganisme.

Dans la transduction, plus directe et issue de la lysogénie, le virus incorpore une partie du matériel génétique de son hôte au sien puis l'injecte dans un autre hôte (Fuhrman, 2001). Ce phénomène est plus significatif pour les phages tempérés que lytiques mais il existe bien pour les deux.

Bien que l'étendue de ces mécanismes dans les systèmes aquatiques ne soit pas encore bien connue, ils peuvent toutefois avoir un rôle important dans le maintien de la diversité génétique des populations, à travers l'homogénéisation des gènes dans une population hôte donnée, mais également sur son évolution à plus grande échelle de temps (Ackermann, 2001).

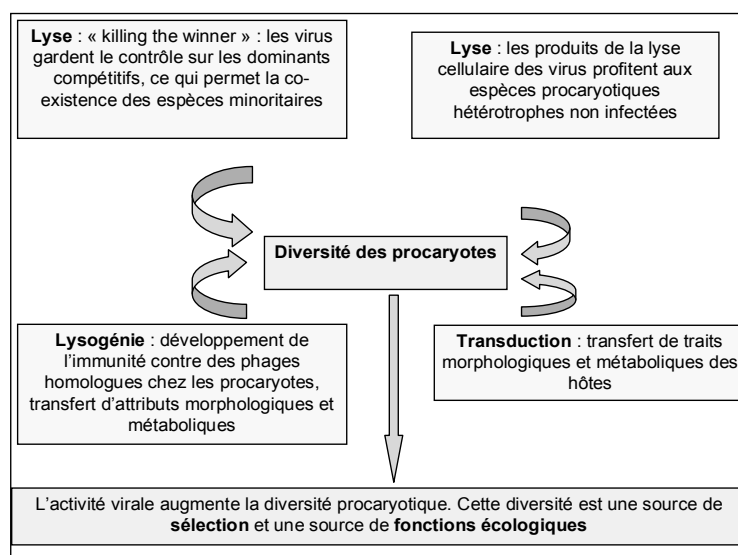


Figure 2. Effets potentiels des virus sur la diversité des procaryotes.
D'après Weinbauer et Rassoulzadegan (2004).

En 1997, Chiura a ainsi démontré l'existence de transfert d'ADN entre un bactériophage marin et une bactérie non marine (entérobactérie de type *Escherichia coli*), ces transferts pouvant atteindre jusqu'à $3,6 \times 10^{-3}$ par particule virale. De la même façon, Jiang et Paul (1998) ont rapporté des fréquences de transduction supérieures à $1,3 \times 10^{14}$ événements par an dans l'estuaire de Tampa Bay (Floride). Plus récemment, Clokie *et al.* (2003) ont pu démontrer pour la première fois que les phages 12 infectant la souche marine *Synechococcus* pouvaient encapsider l'ADN de leur hôte (environ 8 % du génome complet) avec une fréquence totale de 10^{-4} , fournissant de nouveau une évidence de l'importance potentielle des phages dans le transfert horizontal de gènes. Dans une revue bibliographique, Weinbauer et Rassoulzadegan (2004) soutiennent que l'activité virale participe à la variabilité

³ Dans le transfert horizontal, les gènes sont transférés d'un organisme mature, indépendant, à un autre. Ce transfert est différent du transfert génétique vertical où les gènes des parents sont directement transmis à leur descendance.

génétique des procaryotes, permettant ainsi leur fonctionnement écologique et leurs changements évolutifs. La figure 2 résume ces processus de diversification procaryotique *via* les virus.

Thérapie phagique contre infections bactériennes ?

L'émergence de bactéries pathogènes (à l'être humain) résistantes aux antibiotiques actuellement disponibles est un problème critique en médecine, davantage encore depuis que l'on observe une augmentation des patients immunodéprimés. Une des solutions pourrait être la thérapie par les bactériophages (Sulakvelidze *et al.* 2001). Son développement devra associer microbiologie médicale et microbiologie environnementale et c'est pourquoi nous en parlons ici.

La thérapie par les bactériophages consiste en la destruction des bactéries responsables d'une infection par leur(s) virus spécifique(s). Cette technique est inoffensive pour les organismes (êtres humains, animaux, plantes...) auxquels on injecte le virus, puisqu'un bactériophage est un virus ne pouvant infecter et « détruire » que les bactéries ciblées. Peu de temps après sa découverte des bactériophages, Félix d'Hérelle les utilisa pour lutter contre la dysenterie. Les études furent conduites à l'hôpital des enfants malades à Paris en 1919. Félix d'Hérelle, Victor Henry Hutinel (le chef de la pédiatrie de l'époque) et quelques internes s'inoculèrent le virus pour confirmer le caractère inoffensif du bactériophage sur l'être humain, puis l'utilisèrent pour traiter un enfant de douze ans. Les symptômes de dysenterie cessèrent après une seule administration et le garçon guérit quelques jours après. Le laboratoire de F. d'Hérelle produisit ensuite cinq phages contre des infections bactériennes ; l'Eli Lilly Company (Indianapolis, Ind) en produisit sept contre les infections à staphylocoque, streptocoque, *Escherichia coli* et d'autres pathogènes humains. Cependant, de nombreuses failles (comme la non-utilisation de placebo dans les études) permirent de contester les résultats. Ainsi, le Conseil de pharmacie et de chimie de l'Association médicale américaine demanda une revue complète de la littérature sur cette thérapie. En 1934, Monroe, Eaton et Stanhope Bayne-Jones, après avoir analysé plus de 100 publications, conclurent que ce que F. d'Hérelle avait isolé n'était pas un virus mais plutôt une enzyme. Ces conclusions étaient fausses mais néanmoins, avec l'arrivée des antibiotiques quelques années après, cette technique thérapeutique allait complètement disparaître en Europe de l'Ouest et aux États-Unis. Des études se poursuivirent en Union Soviétique et en Europe de l'Est, mais de nombreux travaux ne furent pas accessibles à la communauté internationale.

Depuis quelques années, avec l'émergence de l'écologie virale et la résistance croissante des bactéries aux antibiotiques, des études témoignent d'un regain d'intérêt pour cette thérapie : « Les bactériophages ont de nombreuses caractéristiques les plaçant comme des agents thérapeutiques attractifs. Ils sont : i) hautement spécifiques et très efficaces dans la lyse des pathogènes bactériens cibles ; ii) sauf preuve contraire, inoffensifs pour les organismes que l'on souhaite traiter ; iii) rapidement modifiables pour combattre l'émergence des nouvelles menaces bactériennes. De plus, un large nombre de publications suggèrent que les bactériophages sont des agents thérapeutiques efficaces en sélectionnant les paramètres cliniques. Malheureusement la plupart de ces publications ne remplissent pas les standards rigoureux actuels de l'expérimentation clinique et ils restent encore de nombreuses questions auxquelles il faut répondre avant de pouvoir utiliser les bactériophages en thérapeutique. Cependant nous pensons que le nombre de données et le besoin désespéré de trouver des traitements alternatifs contre la rapide émergence de la résistance des bactéries aux antibiotiques justifient de continuer et développer les études sur cette thérapie. » (A. Saïb, commun. pers.)

Il reste donc encore de nombreuses questions auxquelles il faut répondre avant de pouvoir l'utiliser, comme la lysogénie, la transduction, la spécificité des virus pour leur(s) bactérie(s), la diversité virale, réponses qui pourront être apportées par l'écologie virale, notamment aquatique !

Encadré 3 : Le contrôle viral du réchauffement climatique

L'élévation rapide de la température de notre planète est liée à l'augmentation des gaz à effet de serre d'origine anthropique, c'est-à-dire liée aux diverses activités humaines. Dans l'atmosphère, ces gaz piègent les rayonnements solaires et engendrent l'élévation de la température. Le dioxyde de carbone (CO₂) est le principal gaz à effet de serre. Une des possibilités majeures de faire disparaître l'excédent de CO₂ relargué par les activités humaines se situe dans les écosystèmes aquatiques. En effet, dans les océans, le CO₂ est utilisé par la pompe biologique, pour être transformé en molécule organique et stocké dans les fonds sous-marins. On appelle pompe biologique l'ensemble des organismes impliqués dans le transfert du CO₂ dans les sédiments. Tout commence par les organismes photosynthétiques (le phytoplancton) qui se servent du CO₂ comme source de carbone pour synthétiser leurs composants essentiels : les molécules organiques. Ces organismes sont alors consommés par des prédateurs incapables de synthétiser leur propre matière organique à partir de molécules minérales. Ces prédateurs sont, à leur tour, consommés par des prédateurs supérieurs et ainsi de suite... Il s'établit donc un réseau trophique, en fait plusieurs. Ces successions de relation prédateur/proie associées à la mortalité naturelle des organismes génèrent une grande quantité de matière organique libre dans l'océan. Cette matière libre est désignée par le terme de matière organique dissoute, quand sa taille est inférieure à 0,2 µm, et de matière organique particulaire, quand sa taille est supérieure à 0,2 µm. Par gravité, la matière particulaire se dirige vers les sédiments où elle est stockée. L'autre grande fraction de la matière organique, la matière dissoute est, quant à elle, utilisée par les bactéries hétérotrophes de la colonne d'eau. Ces bactéries utilisent cette matière organique dissoute comme principale source de carbone, c'est-à-dire qu'elles vont reminéraliser cette matière par leur activité respiratoire, et donc réémettre du CO₂ dans l'atmosphère. Contrairement à tous les autres organismes de la pompe biologique, les bactéries représentent un compartiment favorisant le relargage de gaz à effet de serre. Il paraît donc évident que les organismes consommateurs de ces bactéries, comme les protistes hétérotrophes, permettent la ré-injection de la matière organique dans le réseau trophique classique (nutriments-phytoplancton-zooplancton-poissons). Les virus contribuent également à limiter le retour du CO₂ dans l'atmosphère, grâce notamment à leur activité lytique (destruction des cellules) sur les communautés de la pompe biologique. Cette activité permet, en effet, d'inhiber partiellement la respiration cellulaire et, par conséquent, elle met fin à la minéralisation de la matière organique en CO₂. Les communautés virales interviennent donc directement dans la régulation de la quantité de gaz à effet de serre. Cependant le rôle amplificateur ou inhibiteur des virus dans le piégeage des gaz à effet de serre est encore à l'étude. Car, s'il apparaît clairement que le rôle destructeur des virus sur certaines bactéries contribue à diminuer le relargage du CO₂ dans l'atmosphère, ces mêmes virus peuvent au contraire favoriser le développement d'autres bactéries en leur fournissant quantité de matière organique dissoute issue de la lyse de leurs sœurs. Un autre exemple d'effet potentiel indésirable des virus est celui lié à la production du gaz DMS, le diméthyl sulfure. Ce gaz constitue une fraction importante du sulfure atmosphérique d'origine océanique. Les produits de l'oxydation de ce gaz dans l'atmosphère constituent la source majeure des aérosols qui influencent le climat global en diffractant et en absorbant les radiations solaires. Le précurseur majeur du DMS est le diméthylsulfoniopropionate (DMSP), présent dans les organismes phytoplanctoniques (par exemple *Emiliana huxleyi* ou *Phaeocystis pouchetti*). Ces microalgues forment des efflorescences sensibles à la lyse virale et il a été montré que les virus de ces microalgues jouent, potentiellement, un rôle clé dans la libération du DMS dans l'atmosphère (Bratbak *et al.*, 1995 ; Malin *et al.*, 1998).

Actuellement les scientifiques tentent de prévoir dans quelle mesure les océans pourraient compenser les relargages croissants de CO₂ d'origine anthropique. Pour ce faire, une compréhension précise des flux de carbone au sein de la pompe biologique est nécessaire. Elle ne peut avoir lieu sans une étude approfondie du réseau trophique classique, de la boucle microbienne et de l'impact des virus sur les communautés qui la caractérisent.

Citons la furonculose causée par la bactérie *Aeromonas salmonicida*, l'une des principales causes de mortalité chez les salmonidés d'élevage. L'antibiothérapie constitue l'approche thérapeutique la plus répandue. Imbeault et son équipe ont exploré la possibilité d'utiliser des bactériophages comme moyen de prévention pour contrôler les populations de *A. salmonicida*. La sensibilité de 23 souches de *A. salmonicida*, résistantes à aucun, un, deux ou trois antibiotiques, a été évaluée vis-à-vis de 12 bactériophages. Les résultats ont montré que les souches de *A. salmonicida* résistantes aux antibiotiques utilisés dans l'industrie piscicole canadienne sont aussi sensibles à de nombreux bactériophages que les souches sensibles aux antibiotiques. De même, toutes les souches de *A. salmonicida* étudiées sont sensibles à plusieurs bactériophages et, inversement, plusieurs bactériophages sont efficaces contre toutes les souches bactériennes de *A. salmonicida* utilisées. Il est donc possible d'envisager un traitement préventif à base de bactériophages pour lutter contre la furonculose chez les salmonidés d'élevage.

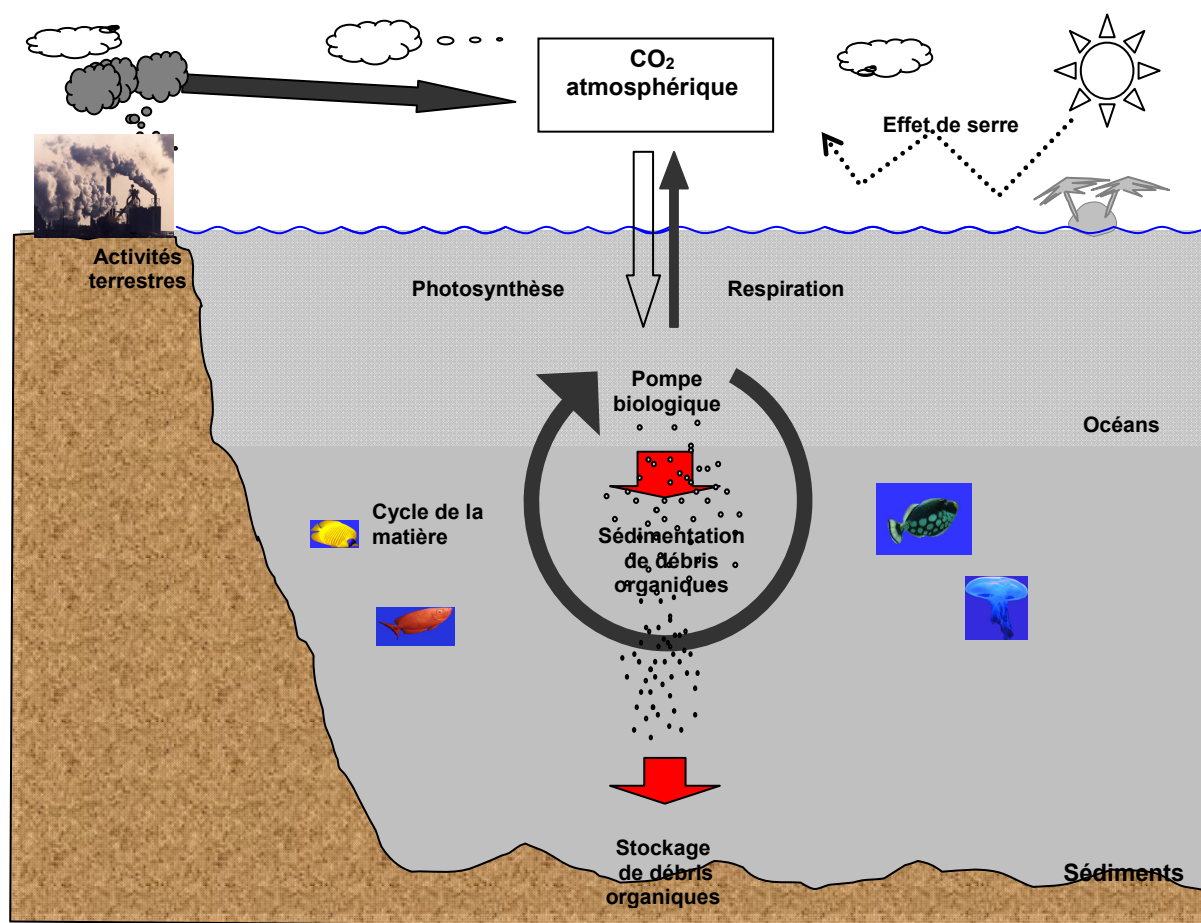


Figure 3. Le contrôle viral du réchauffement climatique (d'après S. Personnic).

L'écologie virale aquatique a le vent en poupe

Les virus sont aujourd'hui reconnus comme un compartiment clé des systèmes microbiens aquatiques. Un de leurs rôles majeurs concerne la mortalité des bactéries auto- et hétérotrophes. De ce processus découle un accroissement de la matière organique disponible pour le compartiment bactérien. En définitive, c'est la totalité du système qui profite de cette stimulation puisque ces processus permettent la redistribution de la nourriture dans la zone euphotique et au-delà. Enfin, nous avons vu que les virus ont une influence importante sur la composition spécifique et les transferts génétiques bactériens. Ainsi, les virus jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement et le maintien de la vie (aquatique et terrestre). Toutes ces découvertes remettent en cause certains résultats obtenus en microbiologie aquatique alors que le compartiment viral n'était pas pris en compte.

Douze équipes sur le territoire national et une équipe à Dakar (Sénégal) appartiennent au réseau Ravage (Réseau français de virologie aquatique en génomique et écologie), créé et animé par Stéphane Jacquet. Deux colloques ont eu lieu fin 2005 et début 2007 afin de promouvoir et structurer ce champ de la recherche en France. Un site web est désormais disponible : <http://virusecologie.free.fr/index.htm>.

Nous espérons que de nombreux autres microbiologistes s'intéresseront à ce compartiment biologique. L'histoire des sciences écologiques de chaque communauté suit un modèle récurrent : découverte de la communauté, développement de techniques d'études, puis acquisition de données sur la dynamique, le

rôle fonctionnel et la diversité. L'écologie bactérienne en est déjà au stade de la connaissance de la diversité bactérienne par les méthodes de la biologie moléculaire.

Aujourd'hui, les laboratoires de microbiologie environnementale s'équipent pour étudier cette diversité bactérienne. N'assisterons-nous pas demain à un transfert de ces recherches sur la diversité virale ? Nous parions que oui, sachant que : la diversité virale (en termes de type/espèce) est sûrement bien plus élevée que la diversité bactérienne ; la dynamique de cette diversité influence la structure et le fonctionnement de la boucle microbienne à la base des réseaux trophiques ; la modélisation des flux de matière dans la biosphère passe par la connaissance de l'ensemble des communautés biologiques, surtout lorsque celles-ci peuvent intervenir directement ou indirectement dans des changements à l'échelle planétaire (encadré 3 et figure 3). Rendez-vous donc dans 10 ans dans un prochain numéro du *Courrier de l'Environnement de l'INRA* ! ■.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier Hélène Montanier et Jean-Christophe Auguet (université de La Rochelle), Thierry Bouvier (université de Montpellier II), Markus Weinbauer (Laboratoire océanologique de Villefranche-sur-Mer) et Ursula Dorigo (équipe de microbiologie à Thonon) pour leur lecture critique et les corrections apportées sur une version antérieure du manuscrit.

Références bibliographiques

- ACKERMANN H.W., 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Archives of Virology*, 146, 843-857.
- ACKERMANN H.W., 2003. Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*, 154, 245-251.
- ACKERMANN H.W., DUBOW M.S., 1987. Viruses of prokaryotes, vol I, general properties of bacteriophages. CRC Press, Boca Raton, 13-47.
- ARRIETA J. M., HERNDL G. J., 2002. Changes in bacterial beta-glucosidase diversity during a coastal phytoplankton bloom. *Limnology and Oceanography*, 47, 594-599.
- AZAM F. T., FENCHEL J. G., FIELD J. S., GRAY L. A., MEYER R., THINGSTAD F., 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, 10, 257-263.
- BERGH Ø., BØRSHEIM K. Y., BRATBAK G., HELDAL M., 1989. High abundances of viruses found in aquatic environments. *Nature*, 340, 467-468.
- BETTAREL Y., SIME-NGANDO T., AMBLARD C., LAVERAN H., 2000. A comparison of methods for counting viruses in aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2283-2289.
- BETTAREL Y., SIME-NGANDO T., AMBLARD C., DOLAN J., 2004. Viral activity in two contrasting lake ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2941-2951.
- BETTAREL Y., BOUVY M., DUMONT C., SIGME-NGANDO T., GESSNER M. O., 2006. Virus-bacterium interactions in water and sediment of west African inland aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5274-5282.
- BRATBAK G., HELDAL M., NORLAND S., THINGSTAD T. F., 1990. Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1400-1405.
- BRATBAK G. F., THINGSTAD T. F., HEDAL M., 1994. Viruses and microbial loop. *Microbial Ecology*, 28, 209-221.
- BRATBAK G., LEVASSEUR M., MICHAUD S., CANTIN G., FERNANDEZ E., HEIMDAL B. R., HELDAL M., 1995. Viral activity in relation to *Emiliana huxleyi* blooms: a mechanism of DSMP release ? *Marine Ecology Progress Series*, 128, 133-142.
- BREITBART M. P., SALOMON B., ANDRESEN J. M., MAHAFFY A. M., SEGALL D., MEAD F., AZAM F. T., ROHWER R., 2002. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99, 14250-14255.
- BRUSSAARD C. P. D., 2004. Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1506-1513.
- BRUSSAARD C. P. D., KUIPERS B., VELDHUIS M. J. W., 2005. A mesocosm study of *Phaeocystis globosa* population dynamics. I. Regulatory role of viruses in bloom dynamics. *Harmful Algae* 4:859-874.
- CHISOHLM S. W., OLSON R. J., ZETTLER E. R., GOERICKE R., WATERBURY J. B., 1988. A novel free living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature*, 334, 340-343.
- CHIURA H. X., 1997. Generalized gene transfer by virus-like particles from marine bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 13, 75-83. CLOKIE M. R. J., MILLARD A. D., WILSON W. H., MANN N. H., 2003. Encapsulation of host DNA by bacteriophages infecting marine *Synechococcus* strains. *FEMS Microbiology Ecology*, 46, 349-352.
- DANOVARO R., DELL'ANNO A., PUSCEDDU M., FABIANO M., 1999. Nucleic acid concentrations (DNA, RNA) in the continental and deep-sea sediments of the Eastern Mediterranean: relationships with seasonally varying organic

- inputs and bacterial dynamics. *Deep-Sea Research*, 46, 1077-1094.
- DANOVARO R., DELL'ANNO A., TRUCCO A., SERRESI M., VANUCCI S., 2001. Determination of virus abundance in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1384-1387.
- DRAKE L. A., CHOI K.H., EDWARD HASKELL A. G., DOBBS F. C., 1998. Vertical profiles of virus-like particles and bacteria in the water column and sediments of Chesapeake Bay, USA. *Aquatic Microbial Ecology*, 16, 17-25.
- DUHAMEL S., JACQUET S., 2006. Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 64(3), 316-332.
- EDWARDS R. A., ROHWER F., 2005. Viral metagenomics. *Nature Reviews in Microbiology*, 3(6), 504-510.
- FERRIS M. M., STOFFEL C. L., MAURER T. T., ROWLEN K. L., 2002. Quantitative intercomparison of transmission electron microscopy, flow cytometry, and epifluorescence microscopy for nanometric particle analysis. *Analytical Biochemistry*, 304, 249-256.
- FILIPPINI M., BUESING N., BETTAREL Y., SIME-NGANDO T., GESSNER M.O., 2006. Infection paradox : high abundance but low impact of freshwater benthic viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 : 4893-4898.
- FUHRMAN J.A., SUTTLE C.A., 1993. Viruses in marine planktonic systems. *Oceanography*, 6, 51-63.
- FUHRMAN J. A., NOBLE R. T., 1995. Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnology and Oceanography*, 42, 1236-1242.
- FUHRMAN J.A., 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, 399, 541-548.
- FURHMAN J.A., 2001. Plankton viruses. Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing group. London.
- GLUD R. N., MIDDELBOE M., 2004. Virus and bacteria dynamics of a coastal sediment: implication for benthic carbon cycling. *Limnology and Oceanography*, 49, 2073-2081.
- GOBLER C.J., HUTCHINS D.A., FISHER N.S., COSPER E.M., SANUDO-WILHELMY S.A., 1997. Release and bioavailability of C, N, P, Se and Fe following viral lysis of a marine chrysophyte. *Limnology and Oceanography*, 42, 1492-1504.
- HELDAL M., BRATBAK G., 1991. Production and decay of viruses in aquatic environments. *Marine Ecology Progress Series*, 72, 205-212.
- HENNES K.P., SIMON M., 1995. Significance of bacteriophages for controlling bacterioplankton growth in a mesotrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 333-340.
- JACQUET S., HELDAL M., IGLESIAS-RODRIGUEZ D., LARSEN A., WILSON W., BRATBAK G., 2002. Flow cytometric analysis of an *Emiliana huxleyi* bloom terminated by viral infection. *Aquatic Microbial Ecology*, 27, 111-124.
- JACQUET S., DOMAISON I., PERSONNIC S., DUHAMEL S., PRADEEP RAM A.S., HELDAL M., SINE-NGANDO T., 2005. Estimates of viral lysis vs. protozoan predation of bacteria of Lake Bourget, France. *Freshwater Biology*, 50, 627-645.
- JIANG S.C., PAUL J.H., 1998. Gene transfer by transduction in the marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2780-2787.
- LEBARON P., SERVAIS P., TROUSSELIER M., COURTIES C., VIVES-REGO J., MUYZER G., BERNARD L., GUINDULAIN T., SCHAFER H., STACKEBRANDT E., 1999. Changes in bacterial community structure in seawater mesocosms differing in their nutrient status. *Aquatic Microbial Ecology*, 19, 255-267.
- MALIN G., WILSON W. H., BRATBAK G., LISS P. S., MANN N. H., 1998. Elevated production of dimethylsulfide from viral infection of cultures of *Phaeocystis pouchetii*. *Limnology and Oceanography*, 43, 1389-1393.
- MANN N. H., 2003. Phages of the marine cyanobacterial picophytoplankton. *FEMS Microbiology Review*, 27, 17-34.
- MANN N. H., COOK A., MILLARD A., BAILEY S., CLOKIE M., 2003. Bacterial photosynthesis genes in a virus. *Nature* 424:741.
- MARANGER R., BIRD D.F., 1996. High concentrations of viruses in the sediments of Lac Gilbert, Québec. *Microbial Ecology*, 31, 141-151.
- MARIE D., BRUSSAARD C.P.D., THYRHAUG R., BRATBAK G., VAULOT D., 1999. Enumeration of Marine Viruses in Culture and Natural Samples by Flow Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 45-52.
- MATHIAS C.B., KIRSCHNER A.K.T., VELIMIROV B., 1995. Seasonal variations of virus abundance and viral control of the bacterial production in a backwater system of the Danube river. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3734-3740.
- MEI M.L., DANOVARO R., 2004. Virus production and life strategies in aquatic sediments. *Limnology and Oceanography*, 49:459-470.
- MIDDELBOE M., HAGSTRÖM A., BLACKBURN N., SINN B., FISCHER U., BORCH N., PINHASSI J., SIMU K., LORENZ M.G., 2001. Effects of bacteriophages on the population dynamics of four strains of pelagic marine bacteria. *Microbial Ecology*, 42, 395-406.
- MIDDELBOE M., GLUD R. N., 2003. Distribution of viruses and bacteria in relation to diagenetic activity in an estuarine sediment. *Limnology and Oceanography*, 48, 1447-1456.
- NAGAZAKI K., TARUTANI K., YAMAGUCHI M., 1999. Growth characteristics of *Heterosigma akashiwo* virus and its possible use as a microbiological agent for red tide control. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 898-902.
- NOBLE R. T., FUHRMAN J. A., 1998. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 14(2), 113-118.
- NOBLE R.T., MIDDELBOE T.M., FUHRMAN J.A., 1999. Effects of viral enrichment on the mortality and growth of heterotrophic bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 18, 1-13.
- PADAN E., SHILO M., 1973. Cyanophages-Viruses attacking blue green algae. *Bacteriological Reviews*, 37(33), 343-370.
- PAUL J.H., JIANG S.C., ROSE J.B., 1991. Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2197-2204.

- PAUL J.H., ROSE J.B., JIANG S.C., KELLOGG C.A., DICKSON L., 1993. Distribution of viral abundance in the reef environment of Key Largo, Florida. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 718-724.
- PAUL J.H., SULLIVAN M.B., SEGALL A.M., ROHWER F., 2002. Marine phage genomics. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 133, 463-476.
- PEDUZZI P., WEINBAUER M. G., 1993. The submicron size fraction of seawater containing high numbers of virus particles as bioactive agent in unicellular plankton community successions. *Journal of Plankton Research*, 15, 1375-1386.
- PERSONNIC S., DORIGO U., DOMAIZON I., JACQUET S. Seasonal and spatial variability of virio-, bacterio- and picophytoplankton in three peri-alpine lakes. *Freshwater Biology* (soumis)
- RAOULT D., AUDIC S., ROBERT C., ABERGEL C., RENESTO P., OGATA H., LA SCOLA B., SUZAN M., CLAVERIE J.M., 2004. The 1.2-Megabase genome sequence of Mimivirus. *Science*, 306, 1344-1350.
- REGENMORTEL M.H.V.V., 1992. Concept of virus species. *Biodiversity and conservation*, 1, 263-266.
- RIEMANN L., STEWARD G. F., AZAM F., 2000. Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 578-587.
- RUARDIJ P., VELDHUIS M. J. W., BRUSSAARD C. P. D., 2005. Modeling the bloom dynamics of the polymorphic phytoplankter *Phaeocystis globosa*: impact of grazers and viruses. *Harmful Algae*, 4, 941-963.
- SIME-NGANDO T., 1997. Importance des virus dans la structure et le fonctionnement des réseaux trophiques microbiens aquatiques. *Année Biologique*, 36(3), 181-206.
- SIME-NGANDO T., BETTAREL Y., CHARTOGNE C., SEAN K., 2003. The imprint of wild viruses on freshwater microbial ecology. *Recent Research Development in Microbiology*, 7, 481-497.
- SPENCER R., 1955. A marine bacteriophage. *Nature*, 175, 690-691.
- SULAKVELIDZE A., ALAVIDZE Z., MORRIS J.G., 2001. Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 649-659.
- SUTTLE C. A., 1992. Inhibition of photosynthesis in phytoplankton by the submicron size fraction concentrated from seawater. *Marine Ecology Progress Series*, 87, 105-112.
- SUTTLE C. A., 2000. Ecological, evolutionary, and geochemical consequences of viral infection of cyanobacteria and eukaryotic algae. In C. Hurst (ed): *Viral ecology*. Academic Press, San Diego, 247-296.
- SUTTLE C.A., 2005. Viruses in the sea. *Nature*, 437 : 356-361.
- TARUTANI K., NAGAZAKI K., YAMAGUCHI M., 2000. Viral impacts on total abundance and clonal composition of the harmful bloom-forming phytoplankton *Heterosigma akashiwo*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 898-902.
- THINGSTAD T.F., LIGNELL R., 1997. Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *Aquatic Microbial Ecology*, 13, 19-27.
- THYRHAUG R., LARSEN A., THINGSTAD T.F., BRATBAK G., 2003. Stable coexistence in marine algal host-virus systems. *Marine Ecology Progress Series*, 254, 27-35.
- TOMARU Y., TARUTANI K., YAMAGUCHI M., NAGASAKI K., 2004. Quantitative and qualitative impacts of viral infection on a *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) bloom in Hiroshima Bay, Japan. *Aquatic Microbial Ecology*, 34, 227-238.
- TORELLA F., MORITA R., 1979. Evidence by electron micrographs for a incidence of bacteriophage particles in the waters of Yaquina Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 774-778.
- VAN HANNEN E. J., ZWART G., VAN AGTERVELD M.P., GONS H.J., EBERT J., LAANBROEK H.J., 1999. Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 795-801.
- VENTER J. C., REMINGTON K., HEIDELBERG J.F., HALPERN A.L., RUSCH D., EISEN J.A., WU D., PAULSEN I. *et al.* (23 authors), 2004. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304, 66-74.
- VREDE K., STENS DOTTER U., LINDSTRÖM E.S., 2003. Viral and Bacterioplankton Dynamics in Two Lakes with Different Humic Contents. *Microbial Ecology*, 46(4), 406-415.
- WATERBURY J.B., WATSON, S.W., GUILLARD R.R.L., BRAND L.E., 1979. Widespread occurrence of a unicellular marine planktonic cyanobacterium. *Nature*, 277, 293-294.
- WILSON W. H., SCHROEDER D.C., ALLEN M.J., HOLDEN M.T., PARKHILL J., BARELL B.G., CHURCHER C. *et al.* (16 authors), 2005. Complete genome sequence and lytic phase transcription profile of a coccolithovirus. *Science* 309:1090-1092.
- WEINBAUER M. G., HOFLE M.G., 1998. Distribution and life strategies of two bacterial populations in a eutrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3776-3783.
- WEINBAUER M. G., BRETTAR I., HOFLE M.G., 2003. Lysogeny and virus-induced mortality of bacterioplankton in surface, deep, and anoxic marine waters. *Limnology and Oceanography*, 48, 1457-1465.
- WEINBAUER M.G., 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 127-181.
- WEINBAUER M.G., RASSOULZADEGAN F., 2004. Are viruses driving microbial diversification and diversity ? *Environmental Microbiology*, 6, 1-11.
- WILHELM S. W., SUTTLE C.A., 1999. Viruses and Nutrient Cycles in the Sea - Viruses play critical roles in the structure and function of aquatic food webs. *Bioscience*, 49(10), 781-788. WILHELM S.W., SUTTLE C.A., 1999. Viruses and nutrient cycles in the sea. *Biosciences*, 49, 781-788.
- WILHELM S. W., BRIGDEN S. M., SUTTLE C. A., 2002. A dilution technique for the direct measurement of viral production: A comparison in stratified and tidally mixed coastal waters. *Microbial Ecology*, 43 (1), 168-173.
- WOMMACK K.E., COLWELL R.R., 2000. Virioplankton : viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 69-114.